

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau International



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C07K 14/205, A61K 39/106, C07K 16/12, A61K 39/40, G01N 33/569</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 97/12909</b> (43) Date de publication internationale: 10 avril 1997 (10.04.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01552 (22) Date de dépôt international: 4 octobre 1996 (04.10.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/11890 4 octobre 1995 (04.10.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS & VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, Boîte postale 7046, F-69348 Lyon Cédex 07 (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): LISSOLO, Ling [FR/FR]; 691, rue du Vallon, F-69280 Marcy-L'Etoile (FR). (74) Mandataire: AYROLES, Marie-Pauline; Pasteur Mérieux Sérums & Vaccins, Direction Propriété Industrielle, 58, avenue Leclerc, F-69348 Lyon Cédex 07 (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, CN, HU, JP, MX, NO, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: NOVEL MEMBRANE PROTEINS OF HELICOBACTER PYLORI (54) Titre: NOUVELLES PROTEINES MEMBRANAIRES D'HELICOBACTER PYLORI (57) Abstract <p>The invention relates to a protein of <i>Helicobacter pylori</i> in a substantially purified form, susceptible of being obtained from a membrane fraction of <i>H. pylori</i> and of which the molecular weight after electrophoresis on polyacrylamide gel 10 % in the presence of SDS is approximately 54, 50, 32-35 or 30 kDa.</p> (57) Abrégé <p>L'invention a pour objet une protéine d'<i>H. pylori</i> sous forme substantiellement purifiée, susceptible d'être obtenue à partir d'une fraction membranaire d'<i>H. pylori</i> et dont le poids moléculaire après électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % en présence de SDS apparaît de l'ordre de 54, 50, 32-35 ou 30 kDa.</p>			

BEST AVAILABLE COPY

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Bresil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CV	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Sllovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

NOUVELLES PROTEINES MEMBRANAIRES D'*HELICOBACTER PYLORI*

La présente invention a pour objet des protéines d'*Helicobacter pylori* nouvellement  
5 obtenues sous forme substantiellement purifiées, ainsi que les compositions  
pharmaceutiques qui les contiennent.

*Helicobacter* est un genre bactérien caractérisé par des bactéries spiralées à gram  
négatif. Plusieurs espèces colonisent le tractus gastrointestinal des mammifères. On cite en  
10 particulier *H. pylori*, *H. heilmanii*, *H. felis* et *H. mustelae*. Bien que *H. pylori* soit l'espèce  
la plus communément associée aux infections humaines, dans certains cas certes rares, *H.*  
*heilmanii* et *H. felis* ont pu être isolés chez l'homme.

*Helicobacter* infecte plus de 50 % de la population adulte dans les pays développés et  
15 près de 100 % de celle des pays en voie de développement ; ce qui en fait un des agents  
infectieux prédominants au plan mondial.

*H. pylori* est retrouvée exclusivement à ce jour à la surface de la muqueuse de  
l'estomac chez l'homme et plus particulièrement autour des lésions de cratère des ulcères  
20 gastriques et duodénaux. Cette bactérie est à l'heure actuelle reconnue comme l'agent  
étiologique des gastrites antrales et apparaît comme un des cofacteurs requis pour le  
développement des ulcères. Par ailleurs, il semble que le développement des carcinomes  
gastriques puisse être associé à la présence d'*H. pylori*.

25 Il apparaît donc hautement souhaitable de mettre au point un vaccin en vue de  
prévenir ou de traiter les infections à *H. pylori*. Un tel vaccin serait très probablement de  
nature sous-unitaire.

Différentes protéines d'*H. pylori* ont été caractérisées ou isolées à ce jour. Il s'agit  
30 notamment de l'uréase, composée de deux sous-unités A et B de 30 et 67 kDa  
respectivement (Hu & Mobley, Infect. Immun. (1990) 58 : 992 ; Dunn et al, J. Biol. Chem.  
(1990) 265 : 9464 ; Evans et al, Microbial Pathogenesis (1991) 10 : 15 ; Labigne et al, J.  
Bact. (199) 173 : 1920) ; de la cytotoxine vacuolaire de 87 kDa (VacA) (Cover & Blaser, J.  
Biol. Chem. (1992) 267 : 10570 ; Phadnis et al, Infect. Immun. (1994) 62 : 1557 ; WO  
35 93/18150) ; d'un antigène immunodominant de 128 kDa associé à la cytotoxine (CagA,  
also called TagA) (WO 93/18150 ; USP 5 403 924) ; des heat shock protéines HspA et

HspB de 13 et 58 kDa respectivement (Suerbaum et al, Mol. Microbiol. (1994) 14 : 959 ; WO 93/18150) ; d'une catalase de 54 kDa (Hazell et al. J. Gen. Microbiol. (1991) 137 : 57) ; d'une hémagglutinine fibrillaire (HpaA) de 20kDa ; d'une protéine de 15 kDa riche en histidine (Hpn) (Gilbert et al, Infect. Immun. (1995) 63 : 2682) ; d'une protéine de la membrane externe de 30 kDa (Bölin et al, J. Clin. Microbiol. (1995) 33 : 381) ; d'une lipoprotéine de 20 kDa associée à la membrane (Kostrcynska et al, J. Bact. (1994) 176 : 5938) ainsi que d'une famille de porines HopA, HopB, HopC et HopD, de poids moléculaires compris entre 48 et 67 kDa (Exner et al. Infect. Immun. (1995) 63 : 1567).

10 Certaines de ces protéines ont déjà été proposées comme antigènes vaccinaux potentiels. En particulier, l'uréase est reconnue comme étant un antigène de premier choix pouvant être utilisé à cette fin (WO 94/9823 ; WO95/3824 ; WO 95/22987 ; Michetti et al, Gastroenterology (1994) 107 : 1002). Il reste que la recherche de nouveaux antigènes doit être poursuivie, notamment dans la mesure où l'on prévoit que, pour obtenir un effet  
15 vaccinal optimisé, plusieurs antigènes devront être vraisemblablement incorporés dans un vaccin.

En résumé, il apparaît toujours nécessaire d'identifier des antigènes supplémentaires en vue de les incorporer dans un vaccin à forte efficacité.

20

C'est pourquoi l'invention a notamment pour objet une protéine d'*H. pylori* sous forme substantiellement purifiée, susceptible d'être obtenue à partir d'une fraction membranaire d'*H. pylori*, et dont le poids moléculaire après électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % en présence de SDS, apparaît de l'ordre de 54, 50, 32-35 ou 30 kDa.  
25 Lorsque la protéine a un poids moléculaire d'environ 54 kDa on précise en outre qu'elle ne réagit pas avec un antisérum anti-catalase.

Un antisérum anti-catalase d'*H. pylori* peut être notamment préparé selon le procédé d'immunisation décrit dans l'Exemple 5 ci-après, en utilisant une préparation de catalase  
30 obtenue par chromatographie. tel que décrit dans l'Exemple 6.

Par "forme substantiellement purifiée", on entend que la protéine est séparée de l'environnement dans lequel elle existe de manière naturelle. Entre autres, il peut s'agir d'une préparation notamment dépourvue des protéines cytoplasmiques et périplasmiques  
35 d'*H. pylori*.

La protéine membranaire dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 54 kDa est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :

- 5 (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl  $\beta$ -D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;
- (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
- 10 (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20 mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
- (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux, avantageusement en tampon carbonate pH 9,5  
15 contenant 5 % de zwittergent 3-14 ;
- (v) on soumet la fraction membranaire à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Q-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M, avantageusement dans  
20 un tampon carbonate pH 9,5 à 0,1 % de zwittergent 3-14, suivi d'un lavage en NaCl 1 M, avantageusement dans un tampon carbonate pH 9,5 à 0,1 % de zwittergent 3-14 ;
- (vi) on récupère la fraction éluée en début de lavage en NaCl 1 M que l'on soumet à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE Sépharose en  
25 gradient de NaCl 0 - 0,5 M, avantageusement en tampon Tris-HCl pH 7,5 à 0,1 % de zwittergent 3-14 (de manière avantageuse, la fraction en NaCl 1 M est d'abord dialysée contre du tampon Tris-HCl pH 7,5 à 0,1 % de zwittergent 3-14); et
- 30 (vii) on récupère la fraction éluée en NaCl 0,1 - 0,25 M.

La protéine membranaire dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 50 kDa est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :

- 35 (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl  $\beta$ -D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;

- (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
- 5 (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20 mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
- (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux, avantageusement en tampon carbonate pH 9,5 contenant 5 % de zwittergent 3-14 ;
- 10 (v) on soumet la fraction membranaire à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Q-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M, avantageusement dans un tampon carbonate pH 9,5 à 0,1 % de zwittergent 3-14, suivi d'un lavage en NaCl 1 M, avantageusement dans un tampon carbonate pH 9,5 à 0,1 % de zwittergent 3-14 ;
- 15 (vi) on récupère la fraction éluée en début de lavage en NaCl 1 M que l'on soumet à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M, avantageusement en tampon Tris-HCl pH 7,5 à 0,1 % de zwittergent 3-14 (de manière avantageuse, la fraction en NaCl 1 M est d'abord dialysée contre du tampon Tris-HCl pH 7,5 à 0,1 % de zwittergent 3-14) ; et
- 20 (vii) on récupère la fraction éluée en NaCl 0,3 - 0,4 M.
- 25

La protéine membranaire dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 30 kD est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :

- 30 (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl  $\beta$ -D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;
- (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysosyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
- 35

- (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
- 5 (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux, avantageusement en tampon carbonate pH 9,5 contenant 5 % de zwittergent 3-14 ;
- 10 (v) on soumet la fraction membranaire à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Q-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5M, avantageusement dans un tampon carbonate pH 9,5 à 0,1 % de zwittergent 3-14 ;
- 15 (vi) on récupère la fraction éluée en NaCl 0,28 - 0,35M, que l'on soumet à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5M, avantageusement en tampon Tris-HCl pH 7,5 à 0,1 % de zwittergent 3-14 (de manière avantageuse, la fraction en NaCl 1 M est d'abord dialysée contre du tampon Tris-HCl pH 7,5 à 0,1 % de zwittergent 3-14) ; et
- 20 (vii) on récupère la fraction correspondant à l'éluat direct (absence de NaCl).
- La protéine membranaire dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 32-35 kDa est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :
- 25 (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl  $\beta$ -D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;
- (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
- 30 (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20 mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
- (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux, avantageusement en tampon carbonate pH 9,5;
- 35

- (v) on centrifuge la suspension obtenue en (iv) à environ 200 000 xg et on récupère le surnageant ;
- 5 (vi) on abaisse le pH du surnageant obtenu en (v) jusqu'à environ pH 7, avantageusement par dialyse contre du tampon phosphate pH 7 ;
- 10 (vii) on soumet la préparation obtenue en (vi) à une chromatographie échangeuse de cations sur colonne de SP-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M, avantageusement dans un tampon phosphate pH 7 ; et
- (viii) on récupère la fraction éluée en NaCl 0,26 - 0,31 M.

Les protéines de 54, 50, 32 et 30 kDa selon l'invention sont vraisemblablement des protéines membranaires intrinsèques ou des protéines associées à la membrane. La protéine de 54 kDa ne réagit pas avec des anticorps anti-catalase, ni en western blot, ni en dot blot. La protéine de 30 kDa ne réagit pas avec des anticorps anti-sous unité A de l'uréase, ni en western blot, ni en dot blot. La protéine de 32 kDa s'avère être une protéine alcaline ; son poids moléculaire peut apparaître légèrement supérieur e.g. de l'ordre de 35 kDa dans certaines conditions expérimentales.

20 La séquence N-terminale de la protéine de 50 kDa d'une souche d'*H. pylori* (ATCC 43579) est comme suit (code une lettre) : MKEKFNRTKPHVNIGTIGHVDH. Cette information n'exclue pas le fait que des protéines équivalentes susceptibles d'être purifiées selon le procédé indiqué ci-avant puissent avoir une séquence N-terminale légèrement différente, dans la mesure où elles seraient dérivées d'une autre souche bactérienne. Une telle différence reflèterait en effet le phénomène de variance allélique communément rencontré au sein d'une même espèce. Par exemple, une espèce bactérienne est usuellement représentée par un ensemble de souches qui diffèrent entre elles par des caractéristiques alléliques mineures. Un polypeptide qui remplit la même fonction biologique dans différentes souches peut avoir une séquence d'acides aminés qui n'est pas la même pour toutes les souches. Une telle variation allélique se retrouve également au niveau de l'ADN.

35 Les différences alléliques au niveau de la séquence d'acides aminés peuvent être constituées par une ou plusieurs substitutions, délétions ou additions d'acides aminés, qui n'altèrent pas la fonction biologique.



Par "fonction biologique" on entend la fonction de la protéine qui participe à la survie des cellules dans lesquelles la protéine existe de manière naturelle (même si la fonction n'est pas absolument indispensable). Par exemple, la fonction d'une porine est de permettre à des composés présents dans le milieu extérieur d'entrer à l'intérieur de la cellule. La fonction biologique est distincte de la fonction antigénique. Une protéine peut avoir plus d'une fonction biologique.

L'invention a aussi pour objet une protéine sous forme substantiellement purifiée et susceptible d'avoir été purifiée selon un des procédés décrits ci-avant à partir d'une bactérie du genre *Helicobacter* e.g., *H. pylori*, *H. heilmanii*, *H. felis* et *H. mustelae*.

L'invention a également pour objet tout autre protéine ou polypeptide, sous forme substantiellement purifiée, dans la mesure où il est analogue en terme d'antigénicité à une protéine d'*Helicobacter* susceptible d'être purifiée selon l'un des procédés décrits ci-avant. Pour ce qui concerne les polypeptides, il s'agit notamment de polypeptides dérivés par fragmentation ou par mutation d'un ou plusieurs acides aminés, e.g. par délétion, addition ou substitution, d'une protéine qui existe dans la nature et dont la forme purifiée peut être obtenue selon l'un des procédés décrits ci-avant. De tels polypeptides peuvent être notamment obtenus par digestion enzymatique à l'aide de protéases telles que la pepsine ou la trypsine. Il n'est pas nécessaire que de tels polypeptides puissent être purifiés selon l'un des procédés décrits ci-avant.

La présente description fait usage des termes "protéine" et "polypeptide" indépendamment de la taille des molécules (longueur de la chaîne d'acides aminés) et des éventuelles modifications post-traductionnelles. Dans la suite de la description le terme "polypeptide" est réservé pour désigner un produit dérivé d'une protéine par fragmentation ou mutation.

Une protéine ou un polypeptide selon l'invention doit être capable d'être reconnu par des anticorps monospécifiques établis à l'encontre d'une protéine d'*Helicobacter* susceptible d'être purifiée selon l'un des procédés décrits ci-avant. Cette antigénicité spécifique peut être révélée selon un certain nombre de méthodes ; par exemple par Western blot (Towbin et al, PNAS (1979) 76 : 4350), dot blot et ELISA.

En Western blot, le produit destiné à être testé, e.g. soit sous forme de préparation purifiée, soit sous forme d'extrait bactérien, est soumis à une électrophorèse en gel de SDS-

Page (polyacrylamide 10%) tel que décrit par Laemmli U.K., Nature ( 1970) 227 : 680. Après transfert sur une membrane de nitrocellulose, cette dernière est incubée avec un sérum hyperimmun monospécifique dilué dans la gamme des dilutions de 1 : 50 à 1 : 5000, de préférence de 1 : 100 à 1 : 500. L'antigénicité spécifique est démontrée dès qu'une bande correspondant au produit testé présente une réactivité à une des dilutions comprises dans la gamme établie ci-dessus.

En ELISA, le produit destiné à être testé est de préférence utilisé pour recouvrir les puits. On préfère utiliser une préparation purifiée, bien qu'un extrait total puisse être aussi utilisé. En bref, 100 µl d'une préparation à 10 µg de protéine/ml sont distribués dans les puits d'une plaque de 96 puits. La plaque est incubée 2 hrs à 37°C puis une nuit à 4°C. La plaque est lavée avec du tampon PBS (phosphate buffer saline) contenant 0,05 % de Tween 20 (tampon PBS/Tween). Les puits sont saturés avec 250 µl de PBS contenant 1 % de sérum albumine bovine (BSA). On laisse incubé 1 hr à 37°C puis la plaque est lavée avec du tampon PBS/Tween. Un antisérum de lapin monospécifique est dilué en série dans du tampon PBS/Tween contenant 0,5 % de BSA. Cent µl d'une dilution sont ajoutés à chaque puit. La plaque est incubée 90 min à 37°C puis lavée. La plaque est révélée selon des méthodes standards. Par exemple, un conjugué peroxydase-immunoglobuline de chèvre anti-immunoglobulines de lapin est ajouté dans les puits. L'incubation est poursuivie 90 min à 37°C puis la plaque est lavée. On développe la réaction avec le substrat approprié. La réaction est mesurée par colorimétrie (absorbance mesurée par spectrophotométrie). Dans ces conditions, une réaction positive est observée lorsque une valeur de DO de 1 est associée à une dilution d'au moins 1 : 50, de préférence d'au moins 1 : 500. La longueur d'onde appropriée à laquelle on mesure la densité optique dépend du substrat.

En dot blot, on préfère utiliser une préparation purifiée du produit à tester, bien qu'un extrait total puisse être aussi utilisé. En bref, une préparation du produit à tester à 100 µg de protéine/ml est diluée en série deux fois dans du Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Cent µl de chaque dilution sont appliqués sur une membrane de nitrocellulose 0,45 µm dans un appareil de dot blot à 96 puits (Biorad). Le tampon est éliminé par mise sous vide. Les puits sont lavés par ajout de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 et la membrane est séchée à l'air. La membrane est saturée par du tampon bloquant (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 0,15 M, lait écrémé 10 g/l) puis incubée avec un antisérum monospécifique dilué dans la gamme de 1 : 50 à 1 : 5000, de préférence de 1 : 50 à 1 : 500. La réaction est révélée selon des méthodes standards. Par exemple, un conjugué peroxydase-immunoglobuline de chèvre anti-immunoglobulines de lapin est ajouté dans les puits. L'incubation est poursuivie 90 min à

37°C puis la plaque est lavée. On développe la réaction avec le substrat approprié. La réaction est mesurée par colorimétrie ou chimioluminescence. Dans ces conditions, une réaction est positive lorsque l'on observe une coloration au niveau du dépôt sur la feuille de nitrocellulose directement pour révélation par colorimétrie ou sur film photographique pour révélation par chimioluminescence, associée à une dilution d'au moins 1 : 50, de préférence d'au moins 1 : 500.

Selon un mode particulier, une protéine selon l'invention peuvent être notamment obtenue par purification à partir d'*Helicobacter* ou exprimée par voie recombinante dans un système hétérologue (ce qui peut être aussi le cas pour un polypeptide selon l'invention). Dans ce dernier cas, la protéine peut présenter des modifications post-traductionnelles qui ne soient pas identiques à celles de la protéine correspondante issue de la souche d'origine.

L'efficacité thérapeutique ou prophylactique d'une protéine ou d'un polypeptide selon l'invention peut être évalué selon des méthodes standards ; par exemple en mesurant l'induction d'une réponse immunitaire mucoale ou l'induction d'une réponse immunitaire à effet thérapeutique ou protecteur en utilisant e.g. le modèle souris / *H. felis* et les procédures décrites dans Lee et al, Eur. J. Gastroenterology & Hepatology, (1995) 7 : 303 ou Lee et al, J. Infect. Dis. (1995) 172 : 161, à condition de prendre la précaution suivante : Lorsque la protéine est originaire d'une espèce autre que *H. felis*, la souche d'*H. felis* doit être remplacée par une souche d'*Helicobacter* appartenant à l'espèce dont la protéine est originaire et adaptée à cet effet (les autres conditions expérimentales restant identiques). Par exemple, on teste la capacité d'un polypeptide dérivé par fragmentation d'une protéine d'*H. pylori* à induire un effet protecteur ou thérapeutique, en substituant une souche d'*H. pylori*. Une telle souche est proposée par e.g. Kleanthous et al, Abstr. presented at the VIIIth International Workshop on Gastrointestinal Pathology 7-9th July 1995, Edinburgh, Scotland. Un effet protecteur est constaté dès lors qu'une infection dans le tissu gastrique est moindre par rapport à un groupe contrôle. L'infection est évaluée en testant l'activité uréase, la charge bactérienne ou l'infiltration leucocytaire. Par exemple, lorsque l'on constate après épreuve, une réduction de l'activité uréase dans le tissu gastrique, même si elle n'est pas complètement abolie on est en droit d'affirmer qu'il y a protection partielle.

Par conséquent l'invention concerne également (i) une composition de matière comprenant une protéine ou un polypeptide selon l'invention et un diluant ou un support ; en particulier (ii) une composition pharmaceutique notamment destinée à la prévention ou au traitement d'une infection à *Helicobacter*, qui comprend à titre de principe actif une

- protéine ou un polypeptide selon l'invention, en quantité efficace d'un point de vue prophylactique ou thérapeutique ; (iii) l'usage d'une protéine ou un polypeptide selon l'invention à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique ; (iv) l'usage d'une protéine ou un polypeptide selon l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné à la
- 5 prévention ou au traitement d'une infection à *Helicobacter* ; ainsi qu'(v) une méthode d'induction d'une réponse immunitaire à l'encontre d'*Helicobacter* e.g., *H. pylori*, *H. heilmanii*, *H. felis* et *H. mustelae* chez un mammifère, selon laquelle on administre audit mammifère une quantité efficace d'un point de vue immunologique d'une protéine ou d'un polypeptide selon l'invention afin de développer une réponse immunitaire ; en particulier
- 10 (vi) une méthode de prévention ou de traitement d'une infection à *Helicobacter* on administre à un individu une quantité prophylactiquement ou thérapeutiquement efficace d'une protéine ou d'un polypeptide selon l'invention.

- Les méthodes et les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent traiter
- 15 ou prévenir des infections à *Helicobacter* et par conséquent, les maladies gastro-intestinales associées à de telles infections. Il s'agit en particulier, des gastrites aiguës chroniques et atrophiques ; des ulcères peptiques e.g. des ulcers gastriques et duodénaux ; des cancers gastriques ; des dyspepsies chroniques ; des dyspepsies non-ulcéreuses réfractaires ; des métaplasies intestinales et certains lymphomes ( e.g. low grade MALT
- 20 lymphoma).

- Une composition selon l'invention peut être administrée par n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine des vaccins, en particulier au travers d'une surface mucosale (e.g. oculaire, nasale, orale, gastrique, intestinal, rectale, vaginale, ou du
- 25 tractus urinaire) ou par voie parentérale (e.g. sous-cutanée, intradermique, intramusculaire, intraveineuse, ou intrapéritonéale). Le choix de la voie d'administration dépend d'un certain nombre paramètres tel que l'adjuvant associé à la protéine ou au polypeptide selon l'invention. Par exemple, si un adjuvant mucosal est utilisé, on préférera la voie nasale ou orale. Si on utilise une formulation lipidique, on choisira la voie parentérale, de préférence
- 30 la voie sous-cutanée ou intramusculaire.

- Une composition selon l'invention peut comprendre outre une protéine ou un polypeptide selon l'invention, au moins un autre antigène d'*Helicobacter* tel que l'apoenzyme de l'uréase, ou une sous-unité, fragment, homologue, mutant ou dérivé de
- 35 cette uréase.

Pour usage dans une composition selon l'invention, une protéine ou un polypeptide selon l'invention peut être formulé dans ou avec des liposomes, de préférence des liposomes neutres ou anioniques, des microsphères, des ISCOMs ou des pseudo-particules virales (VLPs), afin de favoriser le ciblage de la protéine ou du polypeptide ou d'augmenter la réponse immunitaire. L'homme du métier dispose de ces composés sans difficulté ; par exemple voir Liposomes : A Practical Approach, RRC New ED, IRL press (1990).

Des adjuvants autres que les liposomes peuvent être aussi utilisés. Un grand nombre sont connus de l'homme du métier. De tels adjuvants sont référencés ci-après :

10

Pour administration parentérale, on cite notamment des composés d'aluminium tels que l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate d'aluminium et l'hydroxyphosphate d'aluminium. L'antigène peut être adsorbé ou précipité sur un composé d'aluminium selon des méthodes standards. D'autres adjuvants tels que le RIBI d'ImmunoChem (Hamilton, MT) peuvent être utilisés pour administration parentérale.

15

Pour administration mucosale, on cite notamment les toxines bactériennes e.g. la toxine cholérique (CT), la toxine d'*E. coli* labile à la chaleur (LT) la toxine de *Clostridium difficile* et la toxine *pertussis* (PT) ainsi que les formes détoxifiées (sous-unité, toxoid ou mutant) de ces toxines. Par exemple, une préparation contenant la sous-unité B de la CT (CTB) et en quantité moindre de la CT peut être utilisée. Des fragments, des homologues et des dérivés des ces toxines sont de même appropriés dans la mesure où ils conservent une activité d'adjuvant. De préférence, on utilise un mutant ayant une toxicité réduite. De tels mutants sont décrits e.g. dans WO 95/17211 (Arg-7-Lys CT mutant), WO 95/34323 (Arg-9-Lys Glu-129-Gly PT mutant) et WO 96/6627 (Arg-192-Gly LT mutant). D'autres adjuvants tels que le lipopolysaccharide bactérien majeur (MPLA) de e.g. *E. coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* ou *Shigella flexneri*, peuvent être utilisés pour administration mucosale.

20

25

Des adjuvants utiles à la fois pour administration mucosale et parentérale, incluent notamment le polyphosphazène (WO 95/2415), le DC-chol (3 bétâ-[N-(N',N'-diméthyl aminométhane)-carbamoyl] cholestérol) (USP 5 283 185 et WO 96/14831) et le QS-21 (WO 88/9336).

30

L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai. Le dosage approprié varie en fonction de divers paramètres, par exemple,

35

de l'individu traité (adulte ou enfant) de l'antigène vaccinal lui-même du mode et de la fréquence d'administration, de la présence ou absence d'adjuvant et si présent, du type d'adjuvant et de l'effet désiré (e.g. protection ou traitement), comme cela peut être déterminé par l'homme de l'art. En général, un antigène selon l'invention peut être administré en quantité allant de 10 µg à 500 mg, de préférence de 1 mg à 200 mg. En particulier, on indique qu'une dose parentérale ne doit pas excéder 1 mg, de préférence 100 µg. Des doses plus fortes peuvent être prescrites pour e.g. usage oral. Indépendamment de la formulation, la quantité de protéine administrée à l'homme par voie orale est par exemple, de l'ordre de 1 à 10 mg par prise, et l'on préconise au moins 3 prises à intervalle de 4 semaines.

Une composition selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier on associe une protéine ou un polypeptide selon l'invention avec un diluant ou un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique e.g. de l'eau ou une solution saline tel qu'un tampon de sel de phosphate (PBS), complétée de manière optionnelle avec un sel de bicarbonate tel que du bicarbonate de sodium e.g. 0,1 à 0,5 M lorsque la composition est destinée à l'administration orale ou intragastrique. En général, le diluant ou le support est sélectionné sur la base du mode et de la voie d'administration et de pratiques pharmaceutiques standards. Des diluants et des supports acceptables d'un point de vue pharmaceutique ainsi que tout ce qui est nécessaire à leur usage dans des formulations pharmaceutiques sont décrits dans Remington's Pharmaceutical Sciences, un texte de référence standard dans ce domaine et dans le USP/NP.

De manière plus détaillée, on propose à titre d'exemple, d'administrer une protéine ou un polypeptide selon l'invention par voie orale. A cet effet, une protéine ou un polypeptide selon l'invention peut être encapsulée seule ou en présence d'autres protéines de *H. pylori* dans des capsules de gélatine afin de protéger l'antigène contre la dégradation par le suc gastrique ou bien administrée en présence de bicarbonate de sodium. De telles formulations ont déjà été utilisées pour des compositions pharmaceutiques (Black et al, Dev. Biol. Stand. (1983) 53 : 9). La protéine peut également être encapsulée dans des microsphères de PLGA (copolymères d'acide glycolique et acide lactique) selon le protocole décrit ailleurs (Eldridge et al, Curr. Top. Microbiol. Immuno. (1989) 146 : 59) la protéine peut également être incluse dans des liposomes préparés selon les méthodes conventionnelles largement décrites ("Liposomes : a practical approach. Ed. RRC New, D. Rickwood & B.D. Hames, 1990, Oxford University Press. ISBN 0-19-963077-1).

De manière alternative, une protéine ou un polypeptide selon l'invention peut être administré par voie parentérale. Pour ce faire, une protéine ou un polypeptide selon l'invention est adsorbé sur gel d'alumine de façon tout à fait conventionnelle. La protéine en solution à 1 mg/ml dans un tampon dont le pH est voisin de 6.5 est mise en contact pendant 1 heure avec de l'hydroxyde d'aluminium à 10 mg/ml mesuré à  $AL^{+++}$ . La composition finale de la préparation est la suivante : protéine 50 µg/ml,  $AL^{+++}$  250 µg/ml, merthiolate 1/10 000, le tout en PBS. Comme dans le cas de l'administration orale, 3 injections sont préconisées chacune espacée de 4 semaines de la précédente.

Un polypeptide selon l'invention peut être aussi utile en tant que réactif de diagnostic, par exemple pour détecter la présence d'anticorps anti-*Helicobacter* dans un échantillon biologique e.g. un échantillon de sang. A cette fin, un tel polypeptide comprend de manière avantageuse 5 à 80 acides aminés, de préférence 10 à 50 acides aminés. Un réactif polypeptidique selon l'invention peut être marqué ou pas, selon la méthode de diagnostic mise en oeuvre. Des méthodes de diagnostic sont décrites plus avant dans le texte.

Selon un autre aspect, l'invention fournit un anticorps monospécifique capable de reconnaître une protéine ou un polypeptide selon l'invention.

Par "anticorps monospécifique" on entend un anticorps capable de réagir majoritairement avec une seule protéine d'*Helicobacter*. Un tel anticorps ne peut être obtenu qu'en utilisant une protéine substantiellement purifiée, comme immunogène. Un anticorps selon l'invention peut être polyclonal ou monoclonal ; les monoclonaux peuvent être chimériques (par exemple, constitués par une région variable d'origine murine associée à une région constante humaine) ou humanisée (seules les régions hypervariables sont d'origine animale, par exemple d'origine murine) et/ou par une chaîne simple. Les polyclonaux comme les monoclonaux peuvent aussi être sous forme de fragments d'immunoglobulines par exemple un fragment  $F(ab)_2$  ou Fab. Un anticorps selon l'invention peut aussi être de n'importe quel isotype par exemple IgG ou IgA ; un polyclonal peut être d'un isotype unique ou un mélange de tous ou partie d'entre eux.

Dans la suite du texte, les termes "anticorps monospécifique" et "antisérum monospécifique" seront employés de manière indifférente.

Un anticorps qui est dirigé à l'encontre d'une protéine selon l'invention, peut être produit et par la suite identifié en utilisant un dosage immunologique standard par exemple

analyse par Western blot, dot blot ou ELISA (voir par exemple Coligan et al, Current Protocols in Immunology (1994) John Wiley & sons Inc., New York, NY) ; Antibodies : A laboratory Manual, D. Lane, (1988) Harlow Ed.).

- 5 Un anticorps selon l'invention peut être utile en diagnostic, ainsi qu'en chromatographie d'affinité pour purifier à grande échelle, une protéine ou un polypeptide selon l'invention ; un tel anticorps est aussi potentiellement utile en tant qu'agent thérapeutique dans une procédure d'immunisation passive.
- 10 En conséquence, l'invention fournit également (i) un réactif pour détecter la présence d'*Helicobacter* dans un échantillon biologique, qui comprend un anticorps ou un polypeptide selon l'invention ; et (ii) une méthode de diagnostic pour détecter la présence d'*Helicobacter* dans un échantillon biologique, selon laquelle on met en contact l'échantillon biologique avec un anticorps ou un polypeptide selon l'invention, afin que se
- 15 forme un complexe immunitaire ; de façon optionnelle, on élimine le matériel non lié, et on détecte le complexe immunitaire formé entre l'échantillon et l'anticorps ou le polypeptide selon l'invention, en tant qu'indicateur de la présence d'*Helicobacter* dans l'échantillon ou dans l'organe dans lequel l'échantillon a été prélevé.
- 20 Comme on peut aisément le comprendre, un anticorps selon l'invention permet de tester la présence d'*Helicobacter* dans un extrait gastrique.
- Pour l'utilisation dans un test diagnostic, le réactif peut être présenté sous forme libre ou immobilisé sur support solide ; ce dernier peut être n'importe quel support utilisé
- 25 couramment dans ce domaine par exemple, un tube, une bille ou un puits. L'immobilisation peut être obtenue par des moyens directs ou indirects. Les moyens directs comprennent l'adsorption passive (liaison non covalente) ou des liens covalents entre le support et le réactif. Par "moyen indirect" on signifie qu'un composé anti-réactif capable d'interagir un réactif, est tout d'abord attaché à un support solide. Par exemple, si on utilise un réactif
- 30 polypeptidique, un anticorps capable de le lier peut être utilisé comme anti-réactif, à condition qu'il puisse se lier à un épitope du polypeptide qui n'est pas impliqué dans la reconnaissance des anticorps présents dans les échantillons biologiques. Les moyens indirects peuvent aussi être mis en oeuvre par l'intermédiaire d'un système ligand-récepteur, par exemple en greffant une molécule, telle qu'une vitamine, sur un réactif
- 35 polypeptidique et en immobilisant alors sous forme solide le récepteur correspondant. Ceci est illustré e.g. par le système biotine-streptavidine. De manière alternative, on utilise des



moyens indirects par exemple en ajoutant une queue peptidique au réactif *e.g.* par des moyens chimiques, et en immobilisant le produit greffé par adsorption passive ou par liaison covalente de la queue peptidique.

5 L'invention concerne également un procédé de purification d'une protéine ou d'un polypeptide selon l'invention à partir d'un échantillon biologique, selon lequel on soumet l'échantillon biologique à une chromatographie d'affinité mettant en oeuvre un anticorps monospécifique selon l'invention.

10 A cette fin, l'anticorps peut être polyclonal ou monoclonal, de préférence de type IgG. Des IgGs purifiées peuvent être préparées à partir d'un antisérum selon les méthodes couramment pratiquées (voir par exemple Coligan et al).

Les supports de chromatographie conventionnels de même que des méthodes standard de greffe des anticorps sont décrites par exemple dans : Antibodies : A Laboratory Manual, D. Lane, Harlow Ed. (1988),

20 En bref, un échantillon biologique, de préférence dans une solution tampon, est appliqué à un matériel de chromatographie, de préférence équilibré avec le tampon utilisé pour la dilution de l'échantillon biologique afin que la protéine ou le polypeptide selon l'invention (antigène) puisse être adsorbé sur le matériel. Le matériel de chromatographie, tel qu'un gel ou une résine associé à un anticorps selon l'invention, peut se présenter sous la forme d'un bain ou d'une colonne. Les composants qui restent non-liés sont éliminés par lavage et l'antigène est alors élué dans un tampon d'élution approprié, comme par exemple,

25 un tampon de glycine ou un tampon contenant un agent chaotropique *e.g.* la guanidine HCl, ou une concentration riche en sel (par exemple,  $MgCl_2$  3M). Les fractions éluées sont récupérées et la présence de l'antigène est alors mise en évidence par exemple en mesurant l'absorbance à 280 nm.

30 Un tel procédé de purification peut être par exemple mis en oeuvre pour purifier une protéine à partir d'un extrait total. Néanmoins, si l'anticorps n'est pas parfaitement monospécifique, il convient au préalable d'enrichir le matériel destiné à être soumis à la chromatographie d'immunoaffinité, en quantité de protéine à purifier. Par exemple, un tel procédé peut être mis en oeuvre pour parfaire la purification de la protéine de 32 kDa telle

35 que obtenue selon le procédé décrit ci-avant comportant une étape de purification sur SP-Sépharose.

L'utilité thérapeutique ou prophylactique d'un anticorps selon l'invention peut mise en évidence selon le test de protection de Lee et al, proposé ci-avant pour les protéines ou polypeptides selon l'invention. Ainsi, l'invention a également pour objet (i) une composition de matière comprenant un anticorps monospécifique selon l'invention, et un diluant ou un support ; en particulier, (ii) une composition pharmaceutique comprenant un anticorps monospécifique selon l'invention en quantité efficace d'un point de vue thérapeutique ou prophylactique ; (iii) l'utilisation d'un anticorps monospécifique selon l'invention dans la préparation d'un médicament pour traiter ou prévenir une infection à *Helicobacter* ; ainsi que (iv) une méthode pour traiter ou prévenir une infection à *Helicobacter* (par exemple, *H. pylori*, *H. felis*, *H. mustelae* ou *H. heilmanii*), selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement ou prophylactiquement efficace d'un anticorps selon l'invention, à un individu ayant besoin d'un tel traitement.

A cette fin, l'anticorps monospécifique peut être polyclonal ou monoclonal, de préférence d'isotype IgA (d'une manière prédominante). Dans le cadre d'une méthode d'immunisation passive, l'anticorps est administré par voie mucosale à un mammifère, par exemple au niveau de la muqueuse gastrique, soit par voie orale ou intragastrique, avantageusement en présence d'un tampon bicarbonate. Un anticorps monospécifique selon l'invention peut être administré en tant que seul composant actif ou en mélange comprenant au moins un anticorps monospécifique particulier à chaque polypeptide d'*Helicobacter*. La dose d'anticorps qui doit être utilisée dans cette méthode peut être aisément déterminée par l'homme du métier. Par exemple, on indique qu'une posologie peut être caractérisée par une administration journalière comprise entre 100 et 1 000 mg d'anticorps pendant une semaine ; ou une dose comprenant 100 à 1 000 mg d'anticorps administrée trois fois par jour pendant deux à trois jours.

Une composition pharmaceutique comprenant un anticorps selon l'invention peut être fabriquée selon les règles énoncées ci-avant pour une composition comprenant une protéine ou un polypeptide selon l'invention. De même, s'appliquent des indications médicales identiques.

L'invention est illustrée ci-après par référence aux figures suivantes :

La Figure 1 est un schéma récapitulatif du protocole de préparation des fractions membranaires I, II et III d'*H. pylori*.

La Figure 2 présente l'analyse des fractions membranaires I, II et III par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% et coloration au bleu de Coomassie. Les échantillons déposés sont : la fraction membranaire I (colonne 2), la fraction membranaire II (colonne 3), la fraction membranaire III (colonne 4) et les marqueurs de poids moléculaire (colonne 1).

La Figure 3 présente l'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% et coloration au bleu de Coomassie, des protéines purifiées à partir d'un gel préparatif (colonnes 3 à 7). Les échantillons déposés sont : la fraction HpP1 (colonne 3), la fraction HpP2 (colonne 4), la fraction HpP4 (colonne 5), la fraction HpP5 (colonne 6), la fraction HpP6 (colonne 7), les marqueurs de poids moléculaire (colonnes 1 et 8) et la fraction membranaire I (colonne 2).

La Figure 4 présente l'analyse des fractions issues du passage sur DEAE Sépharose, des fractions 7 et 9 (obtenues après elution sur Q Sépharose). Les fractions ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% ou 12,5% et colorées au bleu de Coomassie. Les échantillons déposés sont : la fraction 7 (colonne 2A), la fraction 7.1 (colonne 3A), la fraction 7.2 (colonne 4A), la fraction 9 (colonne 2B), la fraction 9.1 (colonne 3B), la fraction 9.2 (colonne 4B), la fraction 9.3 (colonne 5B) et les marqueurs de poids moléculaire (kDa) (colonne 1A et 1B).

La Figure 5 présente, après électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% et coloration au bleu de Coomassie, le profil électrophorétique de la fraction D issue de la chromatographie sur colonne de Q-Sépharose de la fraction membranaire III (colonne 3) et de la fraction D' issue de la chromatographie sur colonne de S-Sépharose de la fraction D (colonne 4). La colonne 1 correspond aux marqueurs de poids moléculaire et la colonne 2, à la fraction membranaire III.

**EXEMPLE 1 : Préparation des fractions membranaires****1A - Culture**

5           La souche *H. pylori* ATCC 43579 est cultivée en milieu liquide dans un fermenteur de 10 l.

10           Un congelat de germes en glycérol est utilisé pour ensemen-  
          ser un flacon de 75 cm<sup>2</sup> contenant du milieu dit "biphasique" (une phase solide en gélose Colombia  
          contenant 6 % de sang de mouton frais et une phase liquide en trypticase de soja  
          contenant 20 % de sérum de veau foetal). Après 24 heures de culture dans des  
          conditions microaérophiles, la phase liquide de cette culture est utilisée pour  
          ensemencer plusieurs flacons de 75 cm<sup>2</sup> en milieu biphasique en l'absence de sang de  
          mouton. Après 24 heures de culture, la phase liquide permet d'ensemencer un  
15           biofermenteur de 2 l en milieu liquide trypticase soja contenant de la bêta  
          cyclodextrine à 10 g/l. Cette culture à DO 1,5-1,8 est inoculée dans un fermenteur de  
          10 l en milieu liquide. Après 24 heures de culture, les bactéries sont récoltées par  
          centrifugation à 4000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Une culture de 10 litres de *H.*  
          *pylori* ATCC 43579 en fermenteur permet d'obtenir environ 20 à 30 g (poids humide)  
20           de bactéries.

**1B - Extraction par le n octyl β-D glucopyranoside (OG)**

25           Le culot de germes obtenu précédemment est lavé avec 500 ml de PBS  
          (Phosphate buffer saline ; NaCl 7,650 g, phosphate disodique 0,724 g phosphate  
          monopotassique 0,210 g pour un litre ; pH 7,2) par litre de culture. Puis les germes  
          sont à nouveau centrifugés dans les mêmes conditions.

30           Le culot bactérien obtenu (C<sub>1</sub>) est remis en suspension dans une solution d'OG  
          (Sigma) à 1 % (30 ml/litre de culture). La suspension bactérienne est incubée pendant  
          1 heure à température ambiante sous agitation magnétique, puis centrifugée à 17 600  
          x g pendant 30 minutes à 4°C.

35           Le culot (C<sub>2</sub>) est conservé pour être traité par la suite.

Le surnageant (S<sub>2</sub>) obtenu est dialysé (MWCO=10 000 Da. Spectra/por) pendant une nuit à 4°C sous agitation magnétique contre 2 fois 1 litre de PBS dilué au 1/2. Le précipité formé au cours de la dialyse est récupéré par centrifugation à 2 600 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant (S<sub>2d</sub>) est éliminé et le culot (CS<sub>2d</sub>) qui contient des protéines de membrane est conservé à -20°C.

#### 1C - Cassage des germes

Le culot (C<sub>2</sub>) obtenu après centrifugation des germes traités par l'OG est remis en suspension dans du tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,5 et Pefabloc 100 µM (tampon A) puis homogénéisé à l'aide de l'ultra-turrax (3821, Janke & Kungel). L'homogénat obtenu est mis en présence de lysozyme (0.1 mg/ml final) et d'EDTA (1 mM final).

L'homogénat est soniqué 3 fois 2 minutes à 4°C (φ sonde=0.5 cm, puissance=20%, Sonifier 450 Branson), puis ultracentrifugé à 210 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant (S<sub>3</sub>) qui contient des protéines cytoplasmiques et périsplasmiques, est éliminé, alors que le culot (C<sub>3</sub>) est récupéré, lavé en tampon A, puis ultracentrifugé à 210 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Après élimination du surnageant (S<sub>4</sub>), le culot (C<sub>4</sub>) est conservé à -20°C. Ce culot contient des protéines membranaires intrinsèques et périphériques.

La procédure peut être poursuivie par un double lavage du culot C<sub>4</sub> pour éliminer les protéines membranaires périphériques. Le culot C<sub>4</sub> est remis en suspension dans du tampon NaCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9,5, Pefabloc et 100 µM (tampon B). La suspension est ultracentrifugée à 210 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant (S<sub>5</sub>) est éliminé puis le culot (C<sub>5</sub>) est lavé et ultracentrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Après élimination du surnageant (S<sub>6</sub>), le culot (C<sub>6</sub>) qui contient essentiellement des protéines membranaires intrinsèques, est conservé à -20°C.

Les fractions C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub> et CS<sub>2d</sub> sont appelées par la suite respectivement fractions membranaires I, II et III.

#### 1D - Analyse des fractions membranaires

Les différentes fractions membranaires sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS selon la méthode de Laemmli (1970). Les protéines sont visualisées après coloration au bleu de Coomassie.

5 Si on considère les protéines majeures de chaque fraction, les profils SDS-PAGE (Figure 2) montrent que la fraction membranaire I est très proche de la fraction membranaire II. Par contre ces deux dernières diffèrent sensiblement de la fraction membranaire III.

10 Le profil de la fraction membranaire I présente 7 bandes protéiques majeures de poids moléculaires respectifs 87, 76, 67, 54, 50, 47 et 32-35 kDa (colonne 2). Par western blot en présence d'anticorps anti-ureB ou d'anticorps anti-catalase, on a montré que la bande à 67 kDa correspondait à la sous-unité B de l'uréase et la bande à 54 kD correspondait à la catalase. Ces deux protéines ne se retrouvent pas dans le  
15 profil de la fraction II (colonne 3) puisque le lavage en tampon carbonate élimine les protéines faiblement associées à la membrane. Quant au profil protéique de la fraction membranaire III, il montre la présence de 4 bandes majeures à 76, 67, 50 et 30 kDa (colonne 4).

20 **EXEMPLE 2 : Purification des protéines de la fraction membranaire I par SDS-PAGE préparative**

Une électrophorèse est réalisée sur gel de polyacrylamide selon la méthode de Laemmli (1970) avec un gel de concentration de 5% et un gel de séparation de 10%. La  
25 fraction membranaire est remise en suspension dans du tampon A, puis diluée au demi dans le tampon échantillon 2X. Le mélange est chauffé 5 minutes à 95°C. Environ 19 mg de protéines sont déposés sur un gel de dimension 16 x 12 cm et d'épaisseur 5 mm. Une prémigration est effectuée à 50 V pendant 2 heures, suivie d'une migration à 65 V pendant la nuit. La coloration du gel au bleu de Coomassie R250 (0.05% dans de l'eau ultrafiltrée)  
30 permet une bonne visualisation des bandes.

Les bandes majeures HpP1, HpP2, HpP4, HpP5 et HpP6 sont découpées au scalpel et broyées à l'ultra-turrax en présence de 10 ou 20 ml de tampon d'extraction Tris-HCl 25 mM pH 8.8, urée 8 M, SDS 10%, phényl méthyl sulfonyl fluorique (PMSF) 100 µM et Pefabloc  
35 100 µM (tampon C). Chaque broyat est filtré sur un préfiltre Millipore AP20 ( $\phi_{\text{filtre}} = 4.7$  cm,  $\phi_{\text{pore}} = 20$  µm) à l'aide d'un extrudeur à une pression de 7 bars, à température

ambiante. Chaque broyat est lavé avec 5 à 10 ml de tampon C et filtré comme précédemment. Les deux filtrats obtenus à partir de chaque broyat correspondant sont rassemblés.

- 5        Chaque filtrat est précipité avec 3 volumes d'un mélange 50 : 50 méthanol 75% et isopropanol 75%, puis ultracentrifugé à 240 000 x g pendant 16 heures à 10°C sur rotor 70 TFT (J8-55, Beckman).

- 10        Chaque culot est repris par 2 ml de tampon de solubilisation NaPO<sub>4</sub> 10 mM pH 7,0, NaCl 1 M, Sarkosyl 0.1%, PMSF 100 µM, Pefabloc 100 µM et urée 6 M (tampon D). L'échantillon solubilisé est dialysé successivement contre 100 ml de tampon D à 4 M d'urée et 0.1% de Sarkosyl, contre 100 ml de tampon D à 2 M d'urée et 0.5% de Sarkosyl et contre 2 fois 100 ml de tampon D sans urée et à 0.5% de Sarkosyl. La dialyse est effectuée pendant 1 heure sous agitation magnétique à température ambiante. Le dialysat final est  
15        incubé pendant 30 minutes dans un bain de glace, puis centrifugé à faible vitesse pendant 10 minutes à 4°C (Biofuge A, Heraeus Sepatech). Le surnageant est récupéré, filtré sur filtre Millipore à 0,45 µm et conservé à -20°C.

Une analyse SDS-PAGE a été réalisée pour chaque fraction (Figure 3).

- 20        L'analyse du profil électrophorétique de chaque fraction montre que les fractions HpP1, HpP2 et HpP4 sont pures avec une seule bande sur gel pour chacune de ces fractions (respectivement à 87, 76 et 54 kDa). La fraction HpP5 présente une bande de forte intensité à 50 kDa légèrement contaminée par une bande à 47 kDa ; de même la fraction HpP6  
25        présente une bande de forte intensité à 32 kDa légèrement contaminée par une bande à 35 kDa.

**EXEMPLE 3 : Purification des protéines membranaires de 30, 50 et 54 kD à partir de la fraction membranaire I**

- 30        **3A - Chromatographie échangeuse d'anions sur Q-Sépharose**

- 35        Une colonne de Q Sépharose de 40 ml ( $\phi=2.5$  cm,  $h=8$  cm) est préparée selon les indications du fabricant (Pharmacia). La colonne est lavée, puis équilibrée avec le tampon NaCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9,5, Pefabloc 100 µM et Zwittergent 3-14 à 0.1%. La chromatographie a été suivie par une détection UV à 280 nm à la sortie de la colonne.

Cent quarante mg de protéines de la fraction membranaire I préalablement solubilisée sont déposées sur la colonne qui est ensuite lavée avec le tampon d'équilibrage ( $\text{NaCO}_3$  50 mM pH 9,5, Pefabloc 100  $\mu\text{M}$  et Zwittergent 3-14 0,1%) jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit stabilisée. Les protéines sont éluées par un gradient de 0,1 à 0,5 M de NaCl dans le tampon d'équilibre (10 fois  $V_T$ ), suivi d'un lavage en tampon d'équilibrage contenant 0,5 et 1 M de NaCl (2 fois  $V_T$ ). Les fractions collectées sont analysées par SDS-PAGE et rassemblées en différents pools selon leur profil électrophorétique, puis conservées à  $-20^\circ\text{C}$ . Les fractions sont

fractions	élution	fractions	élution
1	éluat direct	6	NaCl 0,25-0,28M
2	lavage tamp.équilibre	7	NaCl 0,28-0,35M
3	NaCl 0-0,1M	8	NaCl 0,35-0,5M
4	NaCl 0,1-0,2M	9	début lavage NaCl 1M
5	NaCl 0,2-0,25M	10	fin lavage NaCl 1M

Le bilan protéique montre que 53% des protéines sont éluées au cours du gradient de NaCl 0-0,5 M, 14% des protéines ne se sont pas fixées sur la colonne et 33% des protéines sont éluées au cours du lavage en NaCl 1 M (tableau 5). Les protéines non fixées sur la colonne, correspondent à des protéines alcalines chargées positivement à pH 7,5, alors que les protéines éluées en 1 M NaCl correspondent à des protéines acides fortement chargées à ce pH.

La purification des fractions 7 et 9 est poursuivie comme suit.

### 3B - Séparation des protéines des fractions 7 et 9 par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Sépharose

Une colonne de DEAE Sépharose est préparée selon les indications du fabricant (Pharmacia) pour un volume de gel d'environ 10 ml ( $\phi=1,5$  cm.  $h=5$  cm) (maximal 10 mg protéine/ml de gel). La colonne est lavée, puis équilibrée avec le tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Pefabloc 100  $\mu\text{M}$  et Zwittergent 3-14 à 0,1%. La chromatographie est suivie comme précédemment par une détection UV à 280nm à la sortie de la colonne.



La fraction 7 dialysée au préalable contre le tampon d'équilibre (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Pefabloc 100  $\mu$ M et Zwittergent 3-14 0,1%) contenant 10 mg de protéines, est déposée sur la colonne de DEAE Sépharose. La colonne est lavée en tampon d'équilibre jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit stabilisée. Les protéines sont éluées par un gradient de 0 à 0,5 M de NaCl dans le tampon d'équilibre (10 fois  $V_T$ ), suivi d'un lavage en tampon d'équilibre contenant 1 M de NaCl (2 fois  $\times V_T$ ). Les fractions collectées sont analysées par SDS-PAGE, puis rassemblées en différents pools selon leur profil protéique et conservées à -20°C. Par SDS-PAGE, on montre que la fraction 7.1 (éluat direct) est d'intérêt.

Une purification identique est reconduite avec la fraction 9 contenant 31 mg de protéines. Par SDS-PAGE on montre que les fractions 9.1, 9.2 et 9.3 respectivement éluées à 0,1 -0,25 M NaCl, 0,3 -0,4 M NaCl et 1 M NaCl sont d'intérêt.

Pour la fraction 7 (Figure 4A), les résultats obtenus montrent que seulement une protéine de 30 kDa (colonne 3 ; fraction 7.1) a été enrichie et partiellement séparée après passage sur la colonne de DEAE Sépharose, les autres protéines n'ont pas été séparées. Pour la fraction 9 (Figure 4B), les profils électrophorétiques montrent que deux protéines de 54 et 15 kDa (colonnes 3 et 5 ; fractions 9.1 et 9.3) ont été séparées et une protéine de 50 kDa a été enrichie (colonne 4 ; fraction 9.2). La protéine de 54 kDa de la fraction 9.1 ne réagit pas avec des anticorps anti-catalase.

**EXEMPLE 4 : Purification de la protéine membranaire de 32 kDa à partir de la fraction membranaire I**

La fraction membranaire I est solubilisée en tampon  $\text{NaCO}_3$  50 mM pH 9,5 à température ambiante pendant 30 min sous agitation. La suspension est ensuite centrifugée à 200 000 xg pendant 30 min à +4°C. Le surnageant est dialysé contre du tampon  $\text{NaPO}_4$  50 mM pH 7.0 puis déposé sur une colonne de SP-Sépharose préalablement équilibré avec ce même tampon. Après lavage de la colonne avec ce même tampon, la colonne est soumise à un gradient de NaCl 0-0,5 M. La fraction éluee entre 0,26 et 0,31 M contient la protéine de 32 kDa.

**EXEMPLE 5 : Préparation de sérums hyperimmuns à l'encontre des fractions HpP5 et HpP6.**

Des sérums polyclonaux spécifiques des protéines membranaires majeures *H. pylori* sont obtenus par hyperimmunisation des lapins respectivement avec les antigènes purifiés par SDS-PAGE préparative HpP5 et HpP6. La première injection J0 (sous-cutanée multisites et intramusculaire) est effectuée avec une préparation contenant 50 µg de protéine membranaire émulsionnée en adjuvant complet de Freund, puis les rappels J21 et J42 se font par injection de 25 µg de protéine membranaire en adjuvant incomplet de Freund. Les animaux sont sacrifiés à J60. Les sérums obtenus sont décomplémentés pendant 30 minutes à 56°C et stérilisés par filtration sur membrane de porosité 0.22 µm (Millipore).

L'antisérum anti-HpP5 réagit avec la protéine de 50 kDa isolée dans la fraction 9.2 obtenue dans l'Exemple 3. L'antisérum anti-HpP6 réagit avec la protéine de 32 kDa isolée dans la fraction éluée entre 0,26 - 0,31 M NaCl sur SP-Sépharose, telle qu'obtenue dans l'Exemple 4.

Bien évidemment, le protocole d'immunisation décrit ci-avant peut être utilisé de manière similaire pour produire des antisérums à l'encontre de chacune des protéines purifiées à l'Exemple 3. Les préparations obtenues dans ces exemples pourront être avantageusement soumises à une électrophorèse préparative sur gel de SDS-PAGE. Les bandes protéiques seront traitées comme précédemment afin d'obtenir une préparation destinée à l'immunisation.

25

**EXEMPLE 6 : Purification d'une catalase à partir d'*H. pylori***

Une culture est réalisée comme décrit dans l'Exemple 1A. Le culot bactérien lavé est remis en suspension dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7.5 contenant du PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride Sigma) 100 µM (tampon A) à concentration finale de 0,1 g (poids humide) par millilitre. La suspension est homogénéisée à l'aide d'un mixeur de type Ultraturrax. Les cellules bactériennes sont ensuite cassées par sonication avec un appareil de type Sonifier (Branson) équipé d'une sonde de diamètre 1,8 cm. La sonication s'effectue par intermittence, 1 min de sonication et 1 min de repos sur glace. Une sonication de 10 min est suffisante pour casser complètement 5 g de germes en suspension. Le lysat ainsi obtenu est centrifugé pendant 15 min à 4°C à 4 000 g. Le surnageant est

5 récupéré puis, centrifugé à nouveau à 100 000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant de cette deuxième centrifugation (S2) est récupéré pour une purification chromatographie. La fraction S2 préparée de cette façon conserve environ 90% de l'activité enzymatique "catalase" totale, telle que mesurée selon la technique de Hazell et al (supra) ou Beers & Sizer, J. Biol. Chem. (1952) 195 : 133.

10 La fraction S2 est chargée sur une colonne S-Sépharose (Pharmacia) préalablement équilibrée avec du tampon A. La colonne est lavée avec le même tampon. La chromatographie est suivie avec un détecteur UV à 280 nm pour les protéines et par l'activité enzymatique pour la catalase. Après élimination des protéines non-fixées (l'absorption à 280 nm revient à la ligne de base), la colonne est ensuite lavée avec un gradient de NaCl, 0 à 1M dans du tampon A. Les fractions correspondant au pic de l'activité catalase sont recueillies, concentrées dans une cellule de concentration de type Amicon équipée de membrane dont le seuil de coupure est de 100 000 Daltons. La fraction  
15 concentrée ainsi obtenue est chargée sur une colonne Séphacryl S-300 HR préalablement équilibrée avec du tampon PBS. Les fractions contenant de l'activité catalase sont recueillies, concentrées à 1 mg/ml et dialysées contre le tampon PBS. La solution finale est filtrée sur une membrane de porosité 0,22 µm et conservée à -70°C.

20 La protéine ainsi purifiée présente les caractéristiques suivantes:

- (i) Une activité enzymatique de catalase typique, en l'absence d'activité peroxydase.
- 25 (ii) Un spectre visible typique d'une hémoprotéine, un pic de Soret à 406 nm et les pics d'alpha et de bêta entre 520 nm et 550 nm.
- (iii) Une forme monomérique à 54 kDa en SDS-PAGE avec la séquence N-terminale suivante: MVNKDVKQTAFGAPVWDDNNVITAGPRG.

**EXEMPLE 7** Purification de la protéine membranaire de 50 kDa par immunoaffinité

5       **7.A - Purification des IgGs**

Un sérum hyperimmun anti-fraction HpP5 tel que préparé dans l'Exemple 5, est déposé sur une colonne Protéine A Sépharose 4 Flast Flow (Pharmacia) préalablement équilibrée en Tris-HCl 100 mM pH 8.0. La résine est lavée par 10  
10 volumes de colonne de Tris-HCl 100 mM pH 8.0 puis par 10 volumes de colonne de Tris-HCl 10 mM pH 8.0. Les IgGs sont éluées en tampon glycine 0.1 M pH 3.0. Les IgGs sont collectées en tant que fractions de 5 ml auxquelles est ajouté 0.25 ml de Tris-HCl 1 M pH 8.0. La densité optique de l'éluat est mesurée à 280 nm et les fractions contenant les IgGs sont rassemblées et si nécessaire, congelées à -70°C.

15

**7.B - Preparation de la colonne**

Une quantité appropriée de gel CNBr - activated Sépharose 4B (sachant que 1 g de gel sec donne environ 3,5 ml de gel hydraté et que la capacité du gel est 5 à 10  
20 mg d'IgG par ml de gel) fabriqué par Pharmacia (ref : 17-0430-01) est mis en suspension dans du tampon NaCl 1 mM. Le gel est ensuite lavé à l'aide d'un buchner en ajoutant de petites quantités d'HCl 1 mM. Le volume total d'HCl 1 mM utilisé est de 200 ml par gramme de gel.

25

Les IgGs purifiées sont dialysées pendant 4 hrs à 20 + 5°C contre 50 vol. de tampon phosphate de sodium 500 mM pH 7.5. Elles sont ensuite diluées en tampon phosphate de sodium 500 mM pH 7.5 à une concentration finale de 3 mg/ml.

30

Les IgGs sont incubées avec le gel pendant une nuit à 5 + 3 °C sous agitation rotative. Le gel est mis dans une colonne de chromatographie et lavé avec 2 vol. de colonne de tampon phosphate 500 mM pH 7.5. Le gel est alors transféré dans un tube et incubé en éthanolamine 100 mM pH 7.5 à la température ambiante sous agitation. Il est ensuite lavé par 2 vol. de colonne de PBS. Le gel peut être conservé en PBS merthiolate 1/10 000. La quantité d'IgGs couplées au gel peut être déterminé  
35 en mesurant la différence de densité optique à 280 nm de la solution initiale d'IgGs et de l'éluat direct plus les lavages.

### 7.C - Adsorption et élution de l'antigène

Une préparation protéique d'antigène en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 EDTA 2 mM, par exemple la fraction membranaire I ou II (fraction C4 ou C6 telles qu'obtenue dans l'Exemple 1C et solubilisée en zwittergent) est filtrée au travers d'une membrane de 0,45 µm puis est déposée sur la colonne équilibrée au préalable avec du Tris-HCl 50 mM pH 8.0 EDTA 2 mM, à un débit d'environ 10 ml/hr. Ensuite, la colonne est lavée par 20 vol. de Tris-HCl 50 mM pH 8.0 EDTA 2 mM. de manière alternative, l'adsorption peut être mise en oeuvre en bain ; l'incubation est poursuivie à 5 + 3°C pendant la nuit et sous agitation.

Le gel est lavé par 2 à 6 vol. de tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 6,8. L'antigène est élué avec du tampon glycine 100 mM pH 2.5. L'éluat est récolté dans des fractions de 3 ml auxquelles sont ajoutés 150 µl de tampon phosphate de sodium 1 M, pH 8.0. La densité optique de chaque fraction est mesurée à 280 nm; les fractions contenant l'antigène sont rassemblées et conservées à -70°C. L'analyse par électrophorèse sur gel de SDS-Page 10 % révèle une seule bande à 50 kDa.

### 20 **EXEMPLE 8** Purification de la protéine membranaire de 32 kDa par immunoaffinité

L'Exemple 7 est répété en utilisant l'antisérum anti-fraction HpP6, afin de poursuivre la purification de la fraction éluee entre 0,26 et 0,31 M NaCl comme décrit dans l'Exemple 4. Les fractions collectées après élution et contenant la protéine sont rassemblées en une seule préparation ; celle-ci est analysée par électrophorèse sur gel de SDS Page 10 %. Une seule bande apparaît à 32 kDa.

### 30 **EXEMPLE 9** Test d'agglutination

#### **9.A - Culture**

A partir d'une souche d'*H. pylori* n° ATCC 43579 (disponible auprès de l'ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville MD - USA) conservée en glycérol à -70°C, on ensemence un flacon de 25 cm<sup>2</sup> contenant un milieu biphasique. Le milieu biphasique comprend une phase solide constituée de 10 ml de gelose Colombia

5 (BioMérieux) additionnée de 6 % de sang de mouton frais et une phase liquide constituée de 3 ml de bouillon Trypticase soja (Difco) contenant 20 % de sérum de veau foetal. Les flacons sont placés dans un sac étanche dit "generbag" (BBL) et incubés sous agitation rotative douce à 37°C pendant 48 heures en condition de microaérophilie (8-10 % CO<sub>2</sub>, 5-7 % O<sub>2</sub> et 85-87 % N<sub>2</sub>) obtenu par le System Microaer (BBL).

10 Cette culture de 48 heures est utilisée pour ensemercer de nouveau des flacons contenant du milieu biphase. L'absorbance initiale de cette culture à 600 nm doit être comprise entre 0.15 et 0.2. Les flacons sont incubés dans des conditions identiques à celles décrites précédemment.

15 Après 48 heures, la suspension bactérienne est transvasée dans un tube à essai. L'absorbance de cette culture est mesurée et elle doit se situer entre 3,0 et 3,5 à 600nm. L'aspect des germes est contrôlé sous microscope après une coloration au Gram.

#### 9.B - Antisérums

20 Un antisérum tel qu'obtenu dans l'Exemple 5 est filtré sur une membrane 0,45 µm pour éliminer les petits agrégats s'il en existe avant utilisation.

#### 9.C - Test d'agglutination

25 Sur une lame pour immunoprécipitation à fond noir (Prolabo réf. 10050), on dépose 20 µl d'eau physiologique dans le premier puit, 20 µl de sérum prélevé avant immunisation dans le puit central et 20 µl d'antisérum dans le troisième puits. Vingt µl de suspension bactérienne d'*H. pylori* sont ajoutés dans chacun des trois puits et on mélange ensuite les gouttes à l'aide d'une pipette Pasteur à bout rond fermé.

30 On observe sous une loupe miroir, l'apparition d'une agglutination 5 minutes maximum après avoir réalisé le mélange. L'agglutination est complète lorsque le mélange se présente sous la forme d'une solution limpide comprenant de gros agrégats. Les témoins négatifs, soit avec de l'eau physiologique, soit avec le sérum de pré-immunisation, doivent rester troubles, révélant que la suspension bactérienne est intacte.

35

Les antisérums anti-fraction HpP5 et anti-fraction HpP6 donnent une réaction d'agglutination très forte. Dans les conditions testées, les bactéries d'*H. pylori* s'agglutinent rapidement et la réaction est complète après une minute. Les résultats  
5 indiquent que les protéines de 50 et 32 kDa sont vraisemblablement exposées à la surface d'*H. pylori*.

**EXEMPLE 10** Mise en évidence de l'effet protecteur des protéines membranaires de de 54, 50, 30 et 32 kDa

10 Des groupes d'une dizaine de souris Swiss Webster âgées de 6 à 8 semaines (Taconic Labs, Germantown, NY), sont immunisés par voie intragastrique avec 1, 5, 25, 50 ou 100 µg de l'antigène de 54, 50 ou 30 kDa purifié par chromatographie tel que décrit à l'Exemple 3 ; ou de l'antigène de 32 kDa purifié par chromatographie tel que décrit à l'Exemple 4 ou  
15 par immunoaffinité tel que décrit dans l'Exemple 8 ; ou de l'antigène de 50 kDa purifié par par immunoaffinité tel que décrit dans l'Exemple 7 (préféré). L'antigène est dilué en PBS ou en PBS contenant 0,24 M de bicarbonate de sodium. L'antigène est supplémenté par 5 ou 10 µg de toxine cholérique (CT) (Calbiochem, San Diego) ou de heat-labile toxine (LT) (Berna Products, Coral Gables FL) . Les souris sont tout d'abord anesthésiées avec de  
20 l'isoflurane ; puis la dose est administrée sous un volume d'environ 0,5 ml à l'aide d'une canule. Quatre doses sont administrées à chaque souris à 7-10 jours d'intervalle. Deux semaines après la dernière administration d'antigène, les souris sont éprouvées par une dose unique de la souche *H. pylori* ORV2002 ( $1 \times 10^7$  de bactéries vivantes dans 200 µl de PBS ; DO<sub>550</sub> de 0,5 environ) administrée par voie intragastrique. Un groupe n'ayant reçu aucune  
25 dose d'antigène et servant de contrôle est éprouvé de même. Deux semaines après l'épreuve, les souris sont sacrifiées. Le pourcentage de protection est déterminé soit en mesurant l'activité urease ou en évaluant la charge bactérienne par histologie ainsi que cela est décrit dans Lee et al (supra) ou directement par culture quantitative d'*H. pylori*. Dans ces conditions, on est en mesure d'observer pour chacune des protéines de 54, 50 30 et 32 kDa,  
30 une réduction sensible de la charge infectieuse chez la plupart des souris immunisées avec 25 µg par rapport au groupe contrôle : ceci permet de conclure que les antigènes de 54, 50, 30 et 32 kDa d'*H. pylori* sont au moins partiellement protecteurs ; les meilleurs résultats étant obtenus avec la protéine de 32 kDa (100 % de protection)

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

- 5 (i) DEPOSANT:  
 (A) NOM: Pasteur Merieux serums et vaccins  
 (B) RUE: 58 avenue Leclerc  
 (C) VILLE: Lyon  
 10 (E) PAYS: France  
 (F) CODE POSTAL: 69007  
 (G) TELEPHONE: 72 73 79 31  
 (H) TELECOPIE: 72 73 78 50
- 15 (ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouvelles protéines membranaires  
*d'Helicobacter pylori*
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2
- 20 (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:  
 (A) TYPE DE SUPPORT: Tape  
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
 25 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

- 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 22 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- 35 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine  
 (iii) HYPOTHETIQUE: NON  
 (iv) ANTI-SENS: NON  
 (v) TYPE DE FRAGMENT: N-terminal
- 40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:
- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Lys | Glu | Lys | Phe | Asn | Arg | Thr | Lys | Pro | His | Val | Asn | Ile | Gly | Thr |
| 1   |     |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ile | Gly | His | Val | Asp | His |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 20  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
- 45



## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- 5 (A) LONGUEUR: 29 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 10 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine  
(iii) HYPOTHETIQUE: NON  
(iv) ANTI-SENS: NON  
(v) TYPE DE FRAGMENT: N-terminal
- 15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:
- Met Val Asn Lys Asp Val Lys Gln Thr Thr Ala Phe Gly Ala Pro Val  
1 5 10 15
- 20 Trp Asp Asp Asn Asn Val Ile Thr Ala Gly Pro Arg Gly  
20 25

Revendications

1. Une protéine d'*Helicobacter pylori* sous forme substantiellement purifiée, susceptible d'être obtenue à partir d'une fraction membranaire d'*H. pylori* et dont le poids moléculaire après électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % en présence de SDS, apparaît de l'ordre de 54, 50, 32-35 ou 30 kDa ; à condition que lorsque le poids moléculaire est de 54 kDa, la protéine ne réagisse pas avec un antisérum anti-catalase.
2. Une protéine selon la revendication 1, dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 54 kDa et qui est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :
  - (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl  $\beta$ -D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;
  - (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
  - (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20 mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
  - (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux ;
  - (v) on soumet la fraction membranaire à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Q-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M, suivi d'un lavage en NaCl 1 M ;
  - (vi) on récupère la fraction éluée en début de lavage en NaCl 1 M que l'on soumet à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M ; et
  - (vii) on récupère la fraction éluée en NaCl 0.1 - 0.25 M.

3. Une protéine selon la revendication 1, dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 50 kDa et qui est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :
  - (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl  $\beta$ -D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;
  - (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
  - (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20 mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
  - (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux ;
  - (v) on soumet la fraction membranaire à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Q-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M, suivi d'un lavage en NaCl 1 M ;
  - (vi) on récupère la fraction éluée en début de lavage en NaCl 1 M que l'on soumet à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M ; et
  - (vii) on récupère la fraction éluée en NaCl 0,3 - 0,4 M.
4. Une protéine selon la revendication 3, qui a pour séquence N-terminale la séquence d'acide aminés telle que montrée dans l'ID SEQ NO 1.
5. Une protéine selon la revendication 1, dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 30 kDa et qui est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :
  - (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl  $\beta$ -D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;

- (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
  - (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20 mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
  - (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux ;
  - (v) on soumet la fraction membranaire à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de Q-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M ;
  - (vi) on récupère la fraction éluée en NaCl 0,28 - 0,35 M, que l'on soumet à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M ; et
  - (vii) on récupère la fraction correspondant à l'éluat direct (absence de NaCl).
6. Une protéine selon la revendication 1, dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 32-35 kDa et qui est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :
- (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl  $\beta$ -D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;
  - (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
  - (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20 mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
  - (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux, avantageusement en tampon carbonate pH 9,5 ;
  - (v) on centrifuge la suspension obtenue en (iv) à environ 200 000 xg et on récupère le surnageant ;

- (vi) on abaisse le pH du surnageant obtenu en (v) jusqu'à environ pH 7, avantageusement par dialyse contre du tampon phosphate pH 7 ;
  - (vii) on soumet la préparation obtenue en (vi) à une chromatographie échangeuse de cations sur colonne de SP-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M, avantageusement dans un tampon phosphate pH 7 ; et
  - (viii) on récupère la fraction éluee en NaCl 0,26 - 0,31 M.
7. Une protéine d'*Helicobacter* ou un polypeptide dérivé de la protéine par fragmentation et/ou mutation, sous forme substantiellement purifiée, qui est capable d'être reconnu par un antisérum établi à l'encontre d'une protéine selon l'une des revendications 1 à 6.
  8. Une composition pharmaceutique destinée à la prévention ou au traitement d'une infection à *H. pylori*, qui comprend à titre de principe actif une protéine ou un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7.
  9. Un anticorps monospécifique capable de reconnaître une protéine ou un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7.
  10. Une composition pharmaceutique destinée à la prévention ou au traitement d'une infection à *H. pylori*, qui comprend à titre de principe actif un anticorps monospécifique selon la revendication 9.
  11. Une méthode de diagnostic permettant de détecter la présence d'*Helicobacter* dans un échantillon biologique, selon laquelle on met en contact l'échantillon biologique avec un anticorps selon la revendication 9 ou un polypeptide selon la revendication 7, afin que se forme un complexe immun, on élimine de façon optionnelle, le matériel non lié, et on détecte le complexe immun formé entre l'échantillon et l'anticorps ou le polypeptide.
  12. Un procédé de purification d'une protéine ou d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7, à partir d'un échantillon biologique, selon lequel on soumet l'échantillon biologique à une chromatographie d'affinité mettant en oeuvre un anticorps monospécifique selon la revendication 9.

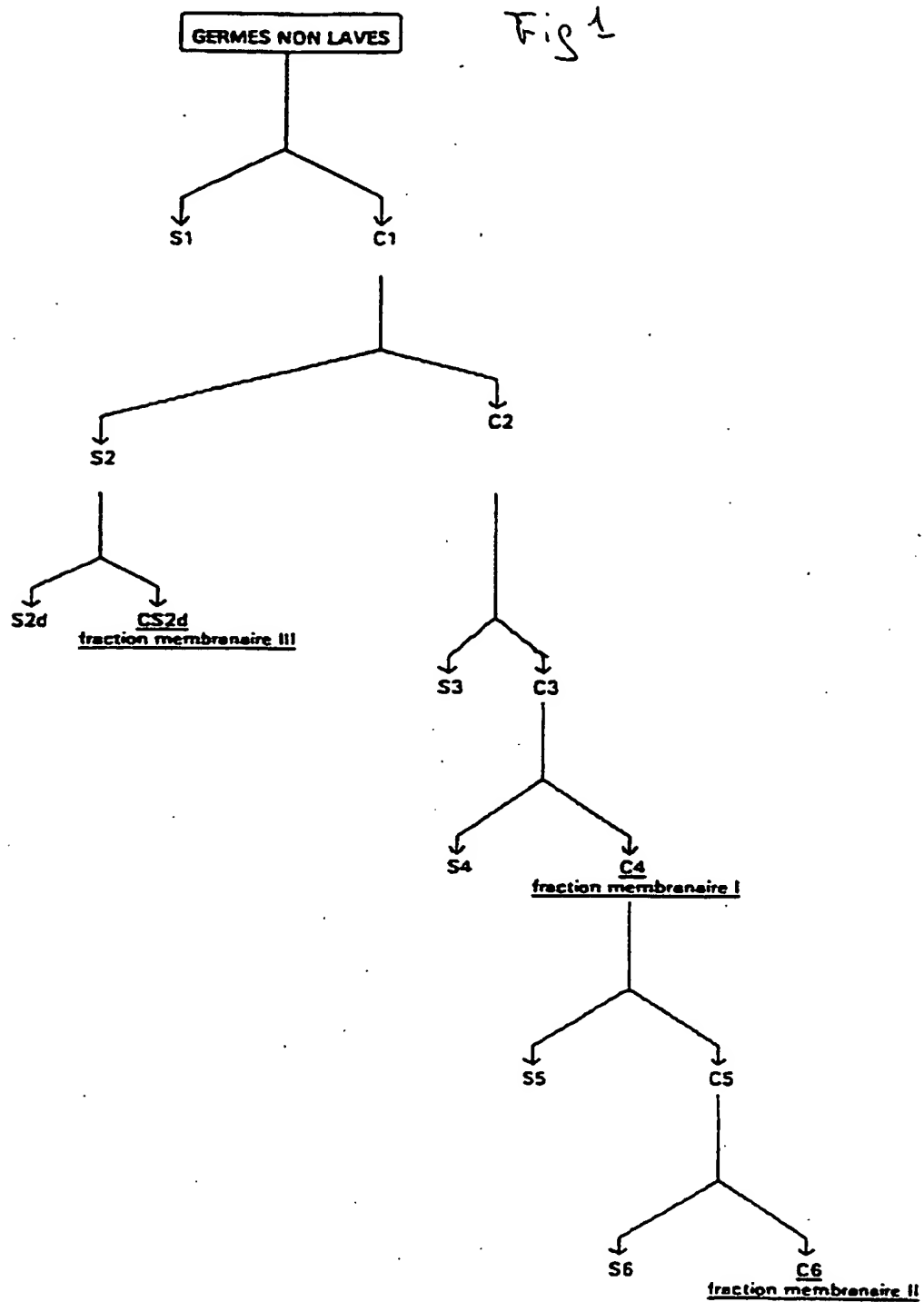


Figure 2

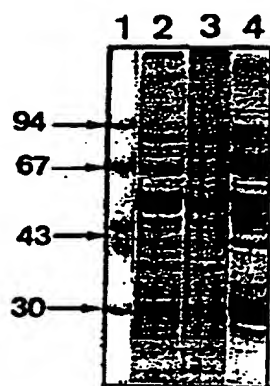


Figure 3

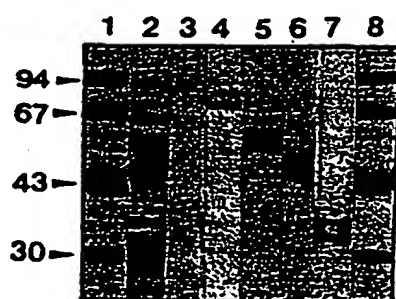




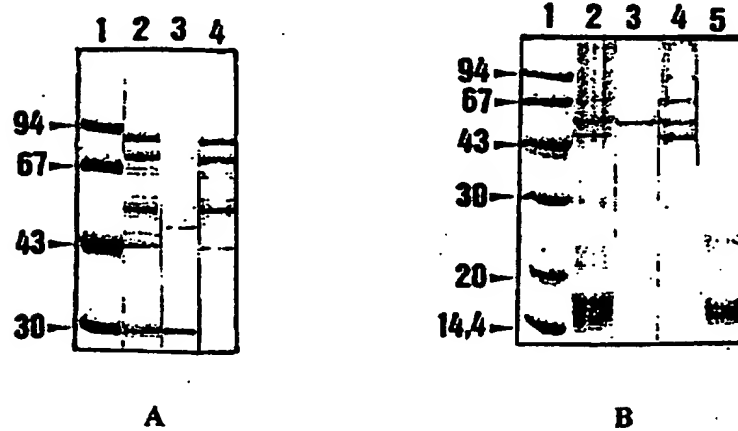
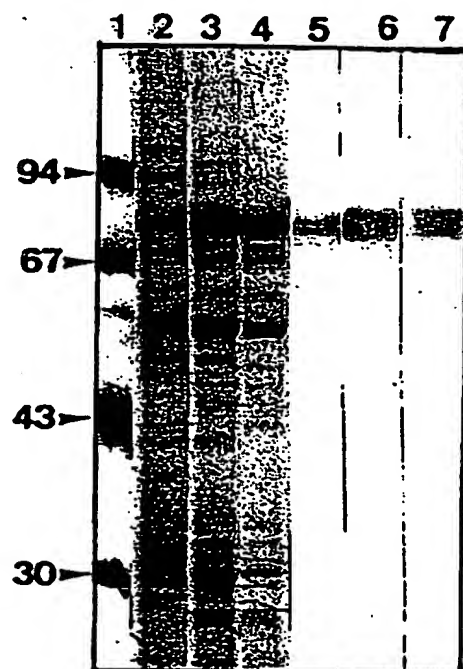
Figure 4

Figure 5



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 96/01552

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07K14/205 A61K39/106 C07K16/12 A61K39/40 G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	INFECTION AND IMMUNITY, vol. 63, no. 4, April 1995, WASHINGTON US, pages 1567-1572, XP002003585 M.H. EXNER ET AL.: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A FAMILY OF PORIN PROTEINS FROM HELICOBACTER PYLORI." cited in the application see the whole document	1,3,7-9
A	FR,A,2 669 929 (QUIDEL CORPORATION) 5 June 1992 see the whole document --- -/--	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January 1997

Date of mailing of the international search report

05.02.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2220 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 631 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 96/01552

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>INFECTION AND IMMUNITY, vol. 62, no. 10, October 1994, WASHINGTON US, pages 4526-4533, XP002003746 P. DOIG ET AL.: "IDENTIFICATION OF SURFACE- EXPOSED OUTER MEMBRANE ANTIGENS OF HELICOBACTER PYLORI." see page 4531, right-hand column, line 47 - page 4532, left-hand column, line 12 ---</p>	1,3,5, 7-9
X	<p>INFECTION AND IMMUNITY, vol. 62, no. 4, April 1994, WASHINGTON US, pages 1392-1399, XP002003747 M.A. TUFANO ET AL.: "IMMUNOBIOLOGICAL ACTIVITIES OF HELICOBACTER PYLORI PORINS." see the whole document ---</p>	1,5,7-9
A	<p>EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY &amp; INFECTIOUS DISEASES, vol. 11, no. 6, June 1992, WIESBADEN, DE, pages 522-526, XP002003748 T.U. WESTBLOM ET AL.: "CATALASE NEGATIVE MUTANTS OF HELICOBACTER PYLORI." see the whole document ---</p>	1,2
A	<p>FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 71, 1990, AMSTERDAM, NL, pages 225-230, XP002003033 C.J. LUKE ET AL.: "IDENTIFICATION OF FLAGELLAR AND ASSOCIATED POLYPEPTIDES OF HELICOBACTER (FORMERLY CAAMPYLOBACTER) PYLORI." see the whole document ---</p>	1,2,7-9
X	<p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 177, no. 19, October 1995, WASHINGTON, D.C., US, pages 5447-5452, XP000570478 P. DOIG ET AL.: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A CONSERVED PORIN PROTEIN FROM HELICOBACTER PYLORI." see page 5447, right-hand column, paragraph 2 see page 5449, right-hand column, paragraph 2 - page 5450, left-hand column, paragraph 1 see page 5451, left-hand column, paragraph 3 -----</p>	1,5-9,11

Form PCT/ISA/210 (continuation of annex sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01552

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2669929	05-06-92	DE-A- 4139840	11-06-92
		IT-B- 1252164	05-06-95
		JP-A- 5264553	12-10-93
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. de Internationale No  
PLI/FR 96/01552

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6 C07K14/205 A61K39/106 C07K16/12 A61K39/40 G01N33/569		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C07K A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	INFECTION AND IMMUNITY, vol. 63, no. 4, Avril 1995, WASHINGTON US, pages 1567-1572, XP002003585 H.M. EXNER ET AL.: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A FAMILY OF PORIN PROTEINS FROM HELICOBACTER PYLORI." cité dans la demande voir le document en entier ---	1,3,7-9
A	FR.A,2 669 929 (QUIDEL CORPORATION) 5 Juin 1992 voir le document en entier --- <div style="text-align: center;">-/--</div>	1-12
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite de cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en abrégé</span> </div>		
<b>* Catégories spéciales de documents cités:</b> <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">22 Janvier 1997</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">05.02.97</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 3818 Patentkan 2 NL - 2220 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 631 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3046		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Ryckebosch, A</div>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Doc. 1e Internationale No  
PLI/FR 96/01552

C(nouv) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>INFECTION AND IMMUNITY, vol. 62, no. 10, Octobre 1994, WASHINGTON US, pages 4526-4533, XP002003746 P. DOIG ET AL.: "IDENTIFICATION OF SURFACE- EXPOSED OUTER MEMBRANE ANTIGENS OF HELICOBACTER PYLORI." voir page 4531, colonne de droite, ligne 47 - page 4532, colonne de gauche, ligne 12</p> <p>---</p>	1,3,5, 7-9
X	<p>INFECTION AND IMMUNITY, vol. 62, no. 4, Avril 1994, WASHINGTON US, pages 1392-1399, XP002003747 M.A. TUFANO ET AL.: "IMMUNOBIOLOGICAL ACTIVITIES OF HELICOBACTER PYLORI PORINS." voir le document en entier</p> <p>---</p>	1,5,7-9
A	<p>EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY &amp; INFECTIOUS DISEASES, vol. 11, no. 6, Juin 1992, WIESBADEN, DE, pages 522-526, XP002003748 T.U. WESTBLOM ET AL.: "CATALASE NEGATIVE MUTANTS OF HELICOBACTER PYLORI." voir le document en entier</p> <p>---</p>	1,2
A	<p>FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 71, 1990, AMSTERDAM, NL, pages 225-230, XP002003033 C.J. LUKE ET AL.: "IDENTIFICATION OF FLAGELLAR AND ASSOCIATED POLYPEPTIDES OF HELICOBACTER (FORMERLY CAAMPYLOBACTER) PYLORI." voir le document en entier</p> <p>---</p>	1,2,7-9
X	<p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 177, no. 19, Octobre 1995, WASHINGTON, D.C., US, pages 5447-5452, XP000570478 P. DOIG ET AL.: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A CONSERVED PORIN PROTEIN FROM HELICOBACTER PYLORI." voir page 5447, colonne de droite, alinéa 2 voir page 5449, colonne de droite, alinéa 2 - page 5450, colonne de gauche, alinéa 1 voir page 5451, colonne de gauche, alinéa 3</p> <p>-----</p>	1,5-9,11

1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à : nombres de familles de brevets

Des le Internationale No

PLI/FR 96/01552

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2669929	05-06-92	DE-A- 4139840	11-06-92
		IT-B- 1252164	05-06-95
		JP-A- 5264553	12-10-93
-----			



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**